

硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0242	硫氧还蛋白氧化还原酶 (TrxR) 活性检测试剂盒	50 管/48 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 90mL ×1 瓶	4°C
试剂二	粉剂×1 瓶: 临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解。	4°C, 避光
试剂三	粉剂×1 瓶: 临用前加入 5 mL 蒸馏水溶解。	4°C
试剂四	液体×1 支	-20°C

一、产品说明

TrxR 是一种 NADPH 依赖的包含 FAD 结构域的二聚体硒酶, 属于吡啶核苷酸-二硫化物氧化还原酶家族成员, 与硫氧还蛋白以及 NADPH 共同构成了硫氧还蛋白系统。TrxR 与 GR 活性类似, 催化 GSSG 还原生成 GSH, 是谷胱甘肽氧化还原循环关键酶之一。

TrxR 催化 NADPH 还原 DTNB 生成 TNB 和 NADP⁺, TNB 在 412 nm 有特征吸收峰, 但还原型谷胱甘肽与 DTNB 同样能反应生成 TNB, 因此本试剂盒利用 2-乙烯吡啶抑制样品中原有的还原型谷胱甘肽, 通过测定 412nm 波长处 TNB 的增加速率, 即可计算 TrxR 活性。

二、自备材料

可见分光光度计、低温离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、蒸馏水。

三、样本准备:

- 1、组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。10000rpm, 4°C离心 10min, 取上清置冰上待检测。
- 2、细菌、真菌: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 s, 间隔 7s, 总时间 3min), 然后 10000rpm, 4°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂一在 25°C (一般物种) 或者 37°C (哺乳动物) 预热 30min。
- 3、空白管: 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 100μL 试剂二, 100μL 试剂三, 800μL 试剂一, 迅速混匀后于 412nm 测定 10s 时吸光度, 然后将比色皿放入 37°C 水浴 5min 后混匀立即测定 310s 吸光度, 记为 A1 和 A2。ΔA 空白管=A2-A1。
- 4、测定管: 取 1mL 玻璃比色皿, 加入 100μL 试剂二, 100μL 试剂三, 700μL 试剂一, 100μL

上清液, 迅速混匀后于 412nm 测定 10s 时吸光度, 然后将比色皿放入 37°C 水浴 5min 后混匀立即测定 310s 吸光度, 记为 A3 和 A4。△A 测定管=A4-A3。

五、TrxR 酶活的计算

1、按照组织样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 25°C 或 37°C 中, 每 mg 蛋白每分钟催化 1 μmol DTNB 还原为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/mg prot)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T \\ = 0.147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}。$$

2、按照组织样本鲜重计算

酶活定义: 在 25°C 或 37°C 中, 每克样品每分钟催化 1 μmol DTNB 还原为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/g 鲜重)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T \\ = 0.147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W。$$

3、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 在 25°C 或 37°C 中, 每 10⁴ 个细胞每 min 催化 1 μmol DTNB 还原为一个酶活力单位。

$$\text{TrxR (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (\text{细胞数量} \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ = 0.147 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}。$$

ε: TNB 在 412nm 处的微摩尔消光系数, 0.0136 L/μmol/cm; d: 比色皿光径, 1cm;

V 反总: 反应体系总体积 (L), 1000 μL = 0.001 L; Cpr: 上清液蛋白质浓度 (mg/mL), 需要另外测定; V 样: 加入反应体系中上清液体积 (mL), 100 μL = 0.1 mL; T: 反应时间 (min), 5 min; W: 样品鲜重, g; V 样总: 提取液体积, 1 mL; 细胞数量: 以 10⁴ 为单位, 以万计。

六、注意事项

1、测定前将上清液与试剂四以 50:1 的体积比混匀(即取 100 μL 上清液加入 2 μL 试剂四混合) 37°C 水浴 30min 后至冰上。

2、测定前须先取 1~2 个样做预实验, 使得吸光值在 5min 内程线性变化。

3、哺乳动物组织及血液制品 TrxR 活力测定时, 一般须用蒸馏水稀释 5 倍左右; 测定过程操作须迅速。